Welche Rolle spielt die Nitritreduktion im Stoffwechsel der denitrifizierenden Bakterien?

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

GENEHMIGT

VON DER PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT

ZU BERLIN.

Von

Otto Wegner

aus Berlin.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

Tag der Promotion: 13. April 1910.

136

Referenten:

Professor Dr. Schwendener.
Professor Dr. Engler.

Universitäts-Buchdruckerei von Gustav Schade (Otto Francke) in Berlin N 24,
Lienenstraße 158.

Meinem Onkel,

Herrn Stadtverordneten Albert Schulze.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535712_0026

Einleitung.

Seit etwa dreißig Jahren kennen wir eine Reihe von Bakterien, die alle in mehr oder weniger hohem Grade die Fähigkeit besitzen, Nitrate und Nitrite zu Stickstoff zu reduzieren, ihre Kulturmedien zu denitrifizieren.

Aufgabe der nachfolgenden Untersuchung sollte sein, festzustellen, welche Rolle diese Reduktion von Nitraten im Stoffwechsel der denitrifizierenden Bakterien spielt. Es ist über diese Frage schon viel diskutiert, ohne daß eine präzise Antwort möglich gewesen wäre. Man hat zum Beispiel daran gedacht, daß es sich bei der Nitratreduktion um eine eigentümliche Art der Gewinnung von Atmungssauerstoff handeln könne. Von anderer Seite ist die Denitrifikation mit der Deckung des Stickstoffbedarfes dieser Organismen in Zusammenhang gebracht worden.

Als Untersuchungsobjekt diente Bacterium actinopelte Baur[1]), eine aus der Ostsee (Kieler Bucht) isolierte Art, die zu einer in der Nord- und Ostsee offenbar sehr verbreiteten Sippe von denitrifizierenden Bakterien gehört.

[1]) E. Baur, Über zwei denitrifizierende Bakterien aus der Ostsee. (Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen, herausgegeben von der Kommission zur Untersuchung der deutschen Meere. Abteilung Kiel. Neue Folge, Band 6, Seite 11.)

Da die Art bisher auf ihren Stoffwechsel noch nicht eingehend untersucht war, ergab sich als erste Aufgabe, den Stoffwechsel einer näheren Prüfung zu unterwerfen. Speziell war zu untersuchen, ob die Denitrifikation der Nährmedien in irgendeiner bestimmten Beziehung zur Art der Ernährung und zur Atmung steht. Über Versuche, die diese Frage klarstellen, sei im folgenden zunächst berichtet.

I. Untersuchung über die Abhängigkeit der Nitritreduktion von der Art der Ernährung und von der Sauerstoffaufnahme.

1. Verhalten in gewöhnlichen Nährböden.

Läßt man Bacterium actinopelte in einer wäßrigen Nährlösung wachsen, welche außer Seesalz, Pepton und Mannit kleine Mengen von Calciumnitrit enthält, so bemerkt man ein bis zwei Tage nach dem Impfen ein lebhaftes Schäumen, herrührend von dem aus dem Calciumnitrit durch die Tätigkeit der Bakterien ausgeschiedenen Stickstoff bzw. Stickstoffoxydul. Das Schäumen dauert je nach der Menge des zugesetzten Nitrits eine längere oder kürzere Zeit. Nach dem Aufhören der Gasentwicklung sieht man auf der Oberfläche der Nährlösung eine dicke Bakterienhaut. Die Nährlösung hat sich stark getrübt, und es findet sich in der vor dem Impfen klaren Flüssigkeit nunmehr ein dicker Niederschlag von Calciumcarbonat, entstanden aus der von den Bakterien ausgeatmeten Kohlensäure und den Kalksalzen der Nährlösung. Die Nährlösung, die vor dem Impfen mit Diphenylamin (in konzentrierter Schwefelsäure gelöst) keine Gasentwicklung, wohl aber eine intensive Blaufärbung gibt (infolge des Nitritgehaltes), braust nach dem Aufhören des Schäumens mit dem genannten Reagens

stark auf, ohne aber Blaufärbung zu zeigen. Das Nitrit ist eben durch die Gärung vollständig zerstört, in Stickstoffoxydul und Stickstoff — und zwar vorherrschend in den letzteren — verwandelt.

Kultiviert man Bacterium actinopelte in einer Nährlösung, welche kein Nitrit enthält, sonst aber dieselbe Zusammensetzung wie die im vorigen Falle verwendete hat, so sieht man auf der Oberfläche eine dicke Bakterienhaut auftreten, genau wie eine solche im vorigen Falle nach dem Aufhören des Schäumens beobachtet wurde. Gasentwicklung und Bildung eines Niederschlages gewahrt man jetzt natürlich nicht. Bacterium actinopelte bedarf also nicht unbedingt des Nitrits zum Wachstum. Das ersieht man auch daraus, daß die Bakterien nach der Nitritzerstörung in ursprünglich nitrithaltigen Nährböden durchaus nicht zugrunde gehen. Wochenlang nach der völligen Beendigung der Denitrifikation findet sich Bacterium actinopelte noch lebend in den nunmehr nitritfreien Nährböden und vermag, von hier in andere, nitrithaltige Bouillon übertragen, in dieser ohne irgendwelche Schwierigkeit sofort Schäumen hervorzurufen. Das Denitrifikationsvermögen dieser Spezies ist völlig konstant: Ich habe Bacterium actinopelte länger als vier Jahre im Laboratorium in Kultur gehalten, ohne in dieser Zeit auch nur im geringsten eine Abnahme des Denitrifikationsvermögens zu bemerken.

2. Bestimmung der als Stickstoff- und Kohlenstoffquellen verwendbaren Stoffe.

a) Stickstoffquellen.

Ich verwendete zu diesen Versuchen Nährlösung, welche in destilliertem Wasser gelöst enthielt: 2,6 Proz. Seesalz, 0,25 Proz. Calciumnitrit, 1 Proz. Mannit (als

Kohlenstoffquelle) und ferner je eine der folgenden Stickstoffverbindungen, in jedem Falle 1 Proz. derselben.

1. Albumin.
2. Pepton.
3. Asparagin.
4. asparaginsaures Natrium.
5. Hämoglobin.
6. Leucin.
7. Harnstoff.
8. Glycocoll.
9. Ammoniumchlorid.
10. Ammoniumsulfat.
11. Ammoniumnitrat.

In diese verschiedenen Nährlösungen wurde Bacterium actinopelte ausgesät. Die Versuche wurden zweimal angestellt, und zwar wurden jedesmal fünf bis sechs Reagensgläschen mit den einzelnen Nährböden beschickt. Bacterium actinopelte vermag nur hochmolekulare Stickstoffquellen zu verarbeiten. Nur in den Nährböden, welche Pepton, Hämoglobin oder Albumin als Stickstoffquellen enthielten, erzielte ich Wachstum und Schaumbildung, in den übrigen Nährböden dagegen nicht.

An dieser Stelle sei noch eine Bemerkung eingeschaltet. Da Bacterium actinopelte ein Meeresorganismus ist, mußte der Nährlösung zweckmäßig Seesalz beigefügt werden. Das Seesalz ist nun oft sehr unrein, enthält zuweilen organische Substanzen, besonders Reste von Meerespflanzen. Diese durch Glühen zu zerstören, ist natürlich aus chemischen Gründen nicht angängig. Ich hatte daher vor Anstellung jedes Versuches zu prüfen, ob die zur Herstellung der Nährböden verwendete Seesalzlösung nicht etwa Stoffe beigemengt enthielt, die geeignete

Stickstoffquellen bildeten. Dies war niemals der Fall. In den zu den verschiedenen Versuchen verwendeten Salzlösungen allein (also ohne Zusatz organischer Stoffe) wuchs Bacterium actinopelte niemals. Das Seesalz erwies sich in jedem Falle für meine Zwecke als brauchbar.

Die oben beschriebenen Kulturversuche zur Ermittelung der Stickstoffquellen wurden bei 30° C vorgenommen, einer für Wachstum der Spezies sehr geeigneten Temperatur. Jedes Röhrchen enthielt 15 ccm der betreffenden Nährlösung, also 3,75 mg Calciumnitrit. Diese Menge wurde im Peptonnährboden in vier Tagen, in der Hämoglobinlösung in vier Tagen und in der Albuminlösung in sieben Tagen zerstört, wie durch Prüfung der Nährlösungen mit Diphenylaminschwefelsäure nach dem Aufhören des Schäumens festgestellt wurde.

Bei den eben beschriebenen Versuchen enthielten die Nährböden außer den erforderlichen Salzen und der hinzugefügten Stickstoffquelle noch Mannit zur Deckung des Kohlenstoffbedarfes. Da nun Pepton, Hämoglobin und Albumin sehr reich an Kohlenstoff sind, so drängte sich von selbst die Frage auf, ob diese Körper nicht allein zur Ernährung genügen, ob sie allein nicht Stickstoff- und Kohlenstoffquellen zugleich sein können. Dies ist der Fall. In Nährlösungen, welche keinen Zusatz von Mannit enthielten, sonst aber genau wie die bei den vorigen Versuchen verwendeten zusammengesetzt waren, also an organischer Substanz nur 1 Proz. Pepton bzw. 1 Proz. Hämoglobin bzw. 1 Proz. Albumin enthielten, erzielte ich gleichfalls Wachstum des Bacterium actinopelte. Jedoch zeigten sich gegenüber den vorigen Versuchen recht erhebliche Unterschiede, indem bei dieser Art der Ernährung die Denitrifikation sehr viel träger

verlief. 3,75 mg Calciumnitrit, der Gehalt von 15 ccm Nährlösung, waren in dem 1 proz. Peptonnährboden jetzt bei 31° in 11 Tagen noch nicht völlig zerstört. Zur Ernährung von Bacterium actinopelte genügen sogar noch schwächere Peptonlösungen als 1 proz. So konnte ich dasselbe kultivieren in Nährlösungen, welche, abgesehen von den erforderlichen anorganischen Salzen, $^1/_2$ Proz. Pepton. bzw. $^1/_4$ Proz. bzw. $^1/_{10}$ Proz. dieses Stoffes enthielten, ohne daß eine besondere Kohlenstoffquelle hinzugefügt worden war. Jedoch zeigte sich, daß in diesen Kulturen die Zerstörung des Nitrites außerordentlich träge verlief. In allen drei Fällen war der Nitritgehalt von 15 ccm Nährlösung (also 37,5 mg) nach 30 Tagen noch nicht zerstört. In der $^1/_2$proz. Peptonlösung war das Schäumen noch ziemlich deutlich sichtbar; in der $^1/_4$proz. und in der $^1/_{10}$proz. Peptonlösung verrieten dagegen nur eine leichte Trübung und ein sehr vereinzeltes Aufsteigen von Gasblasen Wachstum und Denitrifikationstätigkeit der Bakterien. Auch diese Versuche zeigen, wie sehr die Zerstörung des Nitrites von der Art der Ernährung abhängig ist.

b) Kohlenstoffquellen.

Um die Kohlenstoffquellen zu bestimmen, wäre es am zweckmäßigsten gewesen, Kulturversuche in solchen Nährlösungen vorzunehmen, welche außer den erforderlichen anorganischen Salzen und den zu prüfenden Kohlenstoffverbindungen eine konstante Stickstoffquelle enthielten. Dieser Weg war hier nicht gangbar; denn die wenigen mir bekannten brauchbaren Stickstoffquellen, Pepton, Hämoglobin und Albumin, genügten schon — wie ausgeführt — allein als organische Nahrung für Bacterium actinopelte. Ein Wachstum in einer Nährlösung, welche

neben der zu prüfenden Kohlenstoffquelle einen jener stickstoffhaltigen Körper enthält, würde über die Bedeutung des als Kohlenstoffquelle hinzugefügten Körpers nichts aussagen. Nun hatte sich aber andererseits gezeigt, daß ein Zusatz von Mannit zu Pepton- (bzw. Hämoglobin- und Albumin-) Lösungen fördernd auf Wachstum und Denitrifikation einwirkt. Ein Einfluß gewisser Kohlenstoffquellen auf den Gang der Denitrifikation ließ sich also ermitteln, und in diesem Sinne habe ich verschiedene organische Kohlenstoffverbindungen hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit untersucht. Um den Einfluß des Peptons möglichst gering zu gestalten, arbeitete ich mit schwachen Peptonlösungen.

Die zur Kultur verwendeten Nährböden enthielten in 100 g destillierten Wassers gelöst: 2,6 g Seesalz, 0,25 g Calciumnitrat, 0,5 g Pepton und ferner je 1 g der folgenden organischen Kohlenstoffverbindungen:

1. Mannit,
2. Dulcit,
3. Dextrose,
4. Lävulose,
5. Galaktose,
6. Saccharobiose,
7. Calciumlaktat.

Auch hier sei bemerkt, daß jeder Versuch zweimal angestellt wurde; und zwar wurden bei jedem Versuch fünf bis sechs Röhrchen mit den verschiedenen Nährlösungen beschickt und diese dann beimpft. Zum Vergleich wurden auch Kulturversuche unternommen in Nährlösungen, welche keine besonders hinzugefügte Kohlenstoffquelle, sondern nur $^1/_2$ Proz. Pepton neben den erforderlichen anorganischen Salzen enthielten. Wachstum und Schaumbildung erfolgte natürlich in

allen Nährlösungen. Dennoch zeigten sich hinsichtlich der Denitrifikationsstärke recht erhebliche Unterschiede. Die Versuche wurden bei 30° vorgenommen, und in jedem der Reagensröhrchen standen den Bakterien 15 ccm der betreffenden Nährlösung, also stets 37,5 mg Calciumnitrit, zur Verfügung. Diese Menge wurde in der Dextrosenährlösung in drei Tagen, in der Galaktosenährlösung in drei Tagen, in der Lävulosenährlösung in drei Tagen und auch in der Calciumlaktatnährlösung in drei Tagen völlig zerstört. Ungünstiger gestaltete sich die Denitrifikation in den übrigen Nährböden. In der Mannitnährlösung erforderte die Zerstörung der genannten Nitritmenge sieben Tage, in der Maltosenährlösung etwa 20 Tage. In der Dulcit- und in der Saccharobiosenährlösung und in dem Nährboden, dem keine besondere Kohlenstoffquelle hinzugefügt worden war, fanden sich noch nach 20 Tagen mit Diphenylaminschwefelsäure nachweisbare Mengen von salpetriger Säure vor. Demnach wirken Zusätze von Galaktose, Lävulose, Dextrose und von Calciumlaktat stark fördernd auf die Denitrifikation in Peptonlösungen ein, schwächer dagegen Zusätze von Mannit, noch schwächer solche von Maltose. Die Anwesenheit von Dulcit und Saccharobiose übt dagegen keinen Einfluß auf den Gang der Zerstörung des Nitrits durch Bacterium actinopelte aus.

3. Seesalzgehalt der Nährböden.

Die zweite der von mir hinsichtlich des Stoffwechsels gestellten Fragen war die Frage, ob Seesalz zum Wachstum unbedingt notwendig ist oder nicht. Diese Frage ist nach meinem Befund zu verneinen. Die Spezies läßt sich auch in Süßwassernährböden kultivieren. Von Kulturen, die mehrere Jahre hin-

durch in Seewassernährlösungen (2,6 Proz. Seesalz, 1 Proz. Pepton, 1 Proz. Mannit) gezogen worden waren, wurde auf eine Nährlösung übergeimpft, die neben den organischen Nährstoffen $^1/_2$ Proz. Natriumchlorid in gewöhnlichem Leitungswasser gelöst enthielt. In dieser Nährlösung erfolgte ein durchaus normales Wachstum. Von diesen nunmehr an geringen Salzgehalt gewöhnten Bakterienkulturen wurde auf eine Nährlösung übergeimpft, welche nur die organischen Nährstoffe, nicht aber besonders hinzugefügtes Natriumchlorid, in gewöhnlichem Leitungswasser gelöst enthielt. Auch jetzt erfolgte wiederum ein durchaus normales Wachstum.

Es bedarf übrigens nicht der Vorsicht, die Kulturen erst allmählich an den geringen Salzgehalt des Süßwassers zu gewöhnen. Es gelingt auch, Kulturen, die längere Zeit hindurch in Seewassernährböden gezogen worden sind, ohne irgendwelche Zwischenstufen hinsichtlich des dargebotenen Salzgehaltes einzuschalten, direkt in Süßwassernährlösungen zu übertragen und in diesen ein normales Wachstum und einen völlig normalen Verlauf der Denitrifikation zu erreichen. Selbstverständlich muß in solchen Fällen für Anwesenheit reichlicher Mengen von organischen Nährstoffen in den Süßwassernährböden Sorge getragen werden, weshalb diesen also stets mindestens 1 Proz. Pepton und 1 Proz. Mannit hinzugefügt werden muß.

4. Maximale Nitritmenge.

Bei Untersuchung der dritten Frage, der Frage nach der maximalen Menge von Nitrit, welche Bacterium actinopelte in seinen Nährboden zu ertragen vermag, ging ich folgendermaßen vor:

Ich stellte eine Nährlösung her, welche in destilliertem Wasser 1 Proz. Pepton, 1 Proz. Mannit, 2.6 Proz. Seesalz und ferner:

1. 0,5 Proz. Calciumnitrit
2. 1 - -
3. 1,5 - -
4. 2 - -
5. 2,5 - -
6. 3 - -

gelöst enthielt.

Mit jeder dieser sechs Nährlösungen wurden je fünf Reagensgläschen beschickt und Bacterium actinopelte darin ausgesät. Wie immer enthielt jedes Röhrchen 15 ccm der Nährlösung. Wachstum und Schaumbildung bemerkte ich in der $^1/_2$- und 1proz. Nitritlösung, in den übrigen Nährböden nicht. Bei einer Temperatur von 31° wurde die Nitritmenge eines Röhrchens mit $^1/_2$proz. Lösung (75 mg) in 10 Tagen, diejenige eines Röhrchens mit 1proz. Lösung in 40 Tagen zerstört. Bei einem zweiten, mit 1proz. Nährlösung vorgenommenen Versuch konnte ich zwar gleichfalls Wachstum und Schaumbildung beobachten, jedoch war die dargebotene Menge von Calciumnitrit (also 150 mg) noch nach 40 Tagen nicht völlig zerstört. Ein unter gleichen Bedingungen mit $^1/_4$proz. Nährlösung vorgenommener Versuch ergab, daß die in 15 ccm einer solchen Lösung enthaltene Nitritmenge — also 37,5 mg — in 3 Tagen zerstört wird. Vergleicht man die durchschnittlich in einem Tage in den verschiedenen Nitritlösungen vergorenen Mengen des Kalksalzes, so findet man, daß diese am größten in der $^1/_4$proz. Lösung, am geringsten in der 1proz. Lösung ist.

Freilich werden sich die Bakterien nach dieser Richtung nicht immer gleichartig verhalten; es wird

vielleicht möglich sein, die Bakterien allmählich an einen höheren Nitritgehalt zu gewöhnen und mit so angepaßten Stämmen auch bei Darbietung $^1/_2$- und 1 proz. Nitritlösungen eine energischere Denitrifikation zu bewirken, als dies beim vorigen Versuche der Fall gewesen. Daß gerade hinsichtlich der Nitritkonzentration die Anpassung eine gewisse Rolle spielt, darüber belehrte mich folgende Beobachtung. Als ich beim vorigen Versuch zum Aussäen Kulturen benutzte, welche längere Zeit hindurch in $^1/_4$ proz. Nährlösung gezogen worden waren, bemerkte ich bei der Übertragung dieser Kulturen in 1 proz. Nitritnährböden ein deutliches Wachstum und Schäumen erst zwei Wochen nach dem Impfen; bei Übertragung von Kulturen aus $^1/_4$ proz. Lösungen auf $^1/_4$- oder $^1/_2$ proz. Nitritnährböden tritt dagegen das Schäumen und ein sichtbares Wachstum bereits nach einem oder zwei Tagen ein. Offenbar gebrauchte der Organismus im ersten Falle einige Zeit, sich an die neuen Daseinsbedingungen zu gewöhnen.

5. Reduktionsversuche.

Bei den bisher beschriebenen Versuchen war dem Bakterium actinopelte Calciumnitrit zur Reduktion zur Verfügung gestellt worden. Es wurde nun weiter die Frage geprüft, ob Bacterium actinopelte auch noch andere leicht den Sauerstoff abgebende Körper zu reduzieren imstande ist. Zunächst prüfte ich das Verhalten in Calciumnitrat. Bacterium actinopelte wurde in eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung ausgesät:

1000 g Aqua destillata,
1 - Pepton,
1 - Mannit,

2,5 g Calciumnitrat,
26 - Seesalz.

Wie bei Verwendung von Calciumnitrit als zymotische Nahrung tritt kurze Zeit nach dem Impfen Schaumbildung ein, und einige Tage später zeigte eine mit Diphenylaminschwefelsäure vorgenommene Prüfung, daß alles Calciumnitrat zerstört worden ist. 15 ccm Nährlösung, mithin 37,5 mg Calciumnitrat, waren in jedem Röhrchen enthalten. Diese Menge wurde bei 31° in 4 Tagen, bei Zimmertemperatur in 10 Tagen zerstört. Verwendet man das Natriumsalz der Salpetersäure, so verläuft der Prozeß wesentlich langsamer. Der Nitratgehalt eines Röhrchens mit 15 ccm Inhalt wurde bei Zimmertemperatur erst in 14 Tagen völlig zerstört. Der Salpeter wird — sicherlich wenigstens zum Teil — nicht unmittelbar durch die Bakterien in Stickstoff bzw. Stickstoffoxydul verwandelt, sondern es findet zunächst eine Reduktion der Nitrate zu Nitriten statt, die dann weiter zersetzt werden. Für diese Auffassung spricht der Umstand, daß man während der Nitratzerstörung sehr deutlich das Auftreten von salpetriger Säure nachweisen kann. Wenn man nämlich die obige Nährlösung (1 Proz. Pepton, 1 Proz. Mannit, 2,6 Proz. Seesalz, 0,25 Proz. Calciumnitrat in destilliertem Wasser), die vor dem Impfen bei Behandlung mit Kaliumjodidschwefelsäure keine Spur von Jodausscheidung zeigte, nach dem Beginn des Schäumens mit dem genannten Reagens behandelt, so findet eine außerordentlich starke Jodausscheidung statt. Offenbar ist dies eine Folge der entstandenen salpetrigen Säure. Nach dem Aufhören des Schäumens reagiert dann die Nährlösung mit Kaliumjodidschwefelsäure nicht mehr. — Dieser Nachweis der salpetrigen Säure ist meines Erachtens völlig einwandfrei: denn Seesalzpeptonmannitlösungen,

welche keinerlei Zusätze von Nitraten und Nitriten enthalten, und in denen Bacterium actinopelte kultiviert worden ist, vermögen aus Jodkaliumschwefelsäure kein Jod freizumachen. Die oben beobachtete Oxydation des Jodwasserstoffes kann also nur von der salpetrigen Säure herrühren, nicht aber von andern etwa bei der Zerstörung der organischen Stoffe auftretenden Substanzen.

Bei der Zerstörung von Nitraten müssen demnach mindestens zwei verschiedene Vorgänge unterschieden werden, erstens die Überführung des Nitrats in Nitrit und dann die Zerstörung des Nitrits unter Entwicklung von Stickstoff und Stickstoffoxydul. Ob daneben noch ein dritter Vorgang stattfindet, nämlich eine direkte Spaltung des Salpeters, konnte ich nicht feststellen. Unmöglich wäre es ja freilich nicht, daß ein Teil des Salpeters direkt denitrifiziert würde, wenn auch zu einer solchen Annahme kein Grund zwingt. Der erste der erwähnten Vorgänge ist ein Reduktionsprozeß so einfacher und typischer Art, daß derselbe auch ohne Schwierigkeit im Laboratorium nachgeahmt werden kann; die zweite der genannten Reaktionen ist weit verwickelter und nicht als gewöhnlicher Reduktionsprozeß anzusehen, wenn durch ihn auch tatsächlich eine Verminderung des Sauerstoffgehaltes herbeigeführt wird. Der erstere Prozeß legte den Gedanken nahe zu untersuchen, ob Bacterium actinopelte imstande ist, auch andere leicht reduzierbare Substanzen zu reduzieren. Zunächst habe ich das Verhalten des Spaltpilzes gegenüber dem Methylenblau geprüft, einem zu derartigen Versuchen viel verwendeten Stoff.

Ich stellte eine Nährlösung her von folgender Zusammensetzung:

1000 g Aqua destillata,
10 - Pepton,
10 - Mannit,
26 - Seesalz,
1 Tropfen einer 1 proz. wäßrigen Lösung von Methylenblau B X.

Jedes Versuchsröhrchen wurde mit 15 ccm der Lösung beschickt und Bacterium actinopelte darin ausgesät. Es sei noch bemerkt, daß ich die Kultur anaërob vornahm, um einen Einfluß des Luftsauerstoffes auf den Farbstoff zu verhindern — eine unerläßliche Vorsicht. Die Nährlösung in jedem Reagensgläschen wurde daher vor dem Impfen mit einer mehrere Zentimenter hohen Schicht von sterilem Paraffinum liquidum übergossen und dann unter der Luftpumpe die noch in dem Paraffin und der Nährlösung enthaltene Luft so weit wie möglich durch Auspumpen entfernt. Die beimpften Bouillonröhrchen wurden dann mehrere Tage im Thermostaten bei 30° belassen. 2 Tage nach dem Aussäen war die Blaufärbung völlig verschwunden, statt dessen zeigte die Nährlösung die gelbliche Färbung gewöhnlicher Peptonnährböden. Auf der Oberfläche der Lösung unmittelbar unter dem Paraffin wuchs, ein Häutchen bildend, Bacterium actinopelte. Zur Kontrolle wurden mehrere Röhrchen, die in derselben Weise beschickt worden waren, unbeimpft bei 30° aufbewahrt. In diesem behielt die Nährlösung die blaue Farbe: Bacterium actinopelte vermag also Methylenblau zu reduzieren. Drei Versuche, jeder mit 7 Röhrchen vorgenommen, ergaben dasselbe Resultat. Bemerkt sei noch, daß die Bakterienhäutchen, auf Nitritbouillon übergeimpft, daselbst Schäumen hervorriefen.

Bei der beobachteten Entfärbung handelt es sich tatsächlich um eine einfache Reduktion des Farb-

stoffes, nicht dagegen um eine tiefergehende Zersetzung desselben. Es ging dies daraus hervor, daß in demselben Maße, wie die Nährlösung entfärbt, das darüber befindliche Paraffin gebläut wurde. Offenbar war das bei der Reduktion gebildete Produkt von dem Paraffin aufgenommen und dann in diesem von dem Luftsauerstoff oxydiert worden. Man könnte hiergegen einwenden, daß vielleicht das Paraffin rein physikalisch der darunter befindlichen Nährlösung den Farbstoff entzogen habe, und daß durch diesen Vorgang, nicht aber durch die Tätigkeit der Bakterien die Lösung entfärbt worden sei. Dem ist jedoch nicht so; der gleiche Vorgang hätte dann auch in den unbeimpften Kontrollröhrchen vor sich gehen müssen. In diesen blieb jedoch die Nährlösung stets blau und das Paraffin farblos.

Ich habe dann weiter die Einwirkung des Bacterium actinopelte auf Neutralrot untersucht, einen Farbstoff, der gleichfalls zur Demonstration des Reduktionsvermögens benutzt worden ist. Die Nährlösung hatte dieselbe Zusammensetzung wie die im vorigen Falle verwendete, enthielt jedoch auf 1000 ccm einen Tropfen einer 1 proz. Neutralrotlösung an Stelle des Methylenblaus. Die Kultur erfolgte unter denselben Bedingungen wie beim vorigen Versuch (Luftabschluß durch Paraffinum liquidum, Temperatur 30°). Die Nährlösung trübte sich, und wie beim vorigen Versuch zeigte sich auf der Oberfläche derselben unmittelbar unter dem Paraffin ein Häutchen, das, auf nitrithaltige Nährlösungen übertragen, Schaumbildung in denselben hervorrief. Eine Entfärbung trat jedoch nicht ein: dagegen beobachtete ich in einem Teil der Reagensgläschen das Auftreten einer schwachen, aber deutlichen Fluorescenz der Lösung, während in den Nährböden anderer Röhrchen, in

denen Bacterium actinopelte gleichfalls nachweislich gewachsen war, diese Erscheinung ausblieb. Ob diese Fluorescenzerscheinung von einem durch Reduktion aus dem Neutralrot entstandenen Körper herrührt, steht dahin. Bemerkt sei jedoch, daß ich diese Erscheinung niemals in einem der unbeimpften Kontrollröhrchen beobachtet habe, die ich mit den beimpften gleichzeitig im Thermostaten aufbewahrte.

Neben Methylenblau und Neutralrot versuchte ich noch einen dritten Farbstoff zur Demonstration des Reduktionsvermögens zu verwenden: Indigo. Nach den Angaben von Weyl und Kitasato[1]) wird dieser von gewissen Reduktionsorganismen entfärbt. Man verwendet ihn in Form seines disulfonsauren Natriumsalzes, das in der Technik als indigschwefelsaures Natrium bekannt ist. Die verwendete Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung:

1000 g destilliertes Wasser,
10 - Pepton,
10 - Mannit,
26 - Seesalz,
1 - indigschwefelsaures Natrium.

Mit dieser Nährlösung wurden Reagensgläschen beschickt. Nach dem Sterilisieren wurden dieselben beimpft, und wie beim vorigen Versuch wurde die Lösung mit sterilem Paraffinum liquidum übergossen und darauf unter der Luftpumpe die in Lösung und Paraffin enthaltene Luft entfernt. Ich beobachtete auch hier die Vorsicht, einige unbeimpfte Röhrchen zur Kontrolle denselben Prozessen zu unterwerfen. Alle Röhrchen wurden bei 30° im Thermostaten aufbewahrt. Ein Wachstum konnte ich zunächst nicht

[1]) Zur Kenntnis der Anaëroben. Von S. Kitasato und Th. Weyl. (Zeitschrift für Hygiene, Band 8, Seite 44.)

direkt beobachten; denn die 0,1 proz. Indigolösung ist so dunkel gefärbt, daß man das Auftreten der Trübung nicht erkennen kann. Ein Wachstum war aber tatsächlich erfolgt; denn als ich einige Tage später aus den beimpften Indigolösungen auf nitrithaltige Nährböden überimpfte, trat in diesen sehr bald ein Schäumen ein. Eine Entfärbung beobachtete ich jedoch nur in einem der mit Indigolösung beschickten und beimpften Röhrchen; in den übrigen beimpften und auch in den unbeimpften Röhrchen trat keine Entfärbung ein. Die in dem einen Röhrchen beobachtete Entfärbung war auch keine vollständige; sondern nur eine hellere Grünfärbung zeigte sich, wie sie häufig als Durchgangsfarbe bei Bleichung von blauen Farbstofflösungen auftritt. Ich war anfangs geneigt, diese Grünfärbung einer Reduktionstätigkeit seitens der Bakterien zuzuschreiben. Immerhin war es auffällig, daß diese Erscheinung nur in einem der beimpften Röhrchen auftrat, während in den übrigen beimpften und unbeimpften Röhrchen die Nährlösung unverändert geblieben war. An eine spontane Zersetzung, vielleicht eine durch den Luftsauerstoff bedingte Oxydation, glaubte ich zunächst noch nicht; denn Auspumpen der Luft und Absperren derselben schlossen nach meinem Dafürhalten eine solche Wirkung aus. Tatsächlich handelte es sich wohl aber um eine spontane Zersetzung des Farbstoffs, wie sich später deutlicher zeigte. Ich wiederholte diesen Versuch jedoch mit der Modifikation, daß ich der Nährlösung jetzt nur den zehnten Teil der vorher zugesetzten Indigomenge beigab; diese schwächere — 0,01 proz. — Indigolösung mußte ja durch Reduktion sehr viel leichter entfärbbar sein als die beim vorigen Versuch verwendete. Merkwürdigerweise blieb in all den beimpften Röhrchen, in denen Bacterium

actinopelte nachweislich gewachsen war, die Blaufärbung unverändert, während in mehreren der unbeimpften Kontrollröhrchen jetzt völlige Entfärbung eintrat. Die vorher beobachtete Entfärbung hatte mit dem Stoffwechsel von Bacterium actinopelte nichts zu tun. Zweifellos handelte es sich bei diesen Entfärbungen um spontane Zersetzung, nicht aber um eine durch die Bakterien bewirkte Reduktion, wofür auch der Umstand sprach, daß alle beobachteten Entfärbungen durch Schütteln mit Luft nicht rückgängig gemacht werden konnten, wie dies bei den durch Reduktion bedingten Entfärbungen des Indigofarbstoffes möglich ist. Daß diese Bleichung nicht, wie man etwa annehmen könnte, durch ein zufällig als Verunreinigung in die Nährlösung hineingeratenes Bacterium bedingt war, konnte ich leicht feststellen. Denn ein Tröpfchen der entfärbten Nährlösung, auf nicht entfärbte übergeimpft, rief daselbst keine Bleichung hervor. Aus den Versuchen geht also hervor — und weitere Versuche bestätigten dies —, daß Bacterium actinopelte Indigolösung nicht zu reduzieren vermag.

Die Reduktionsversuche und überhaupt die Versuche, welche die eigentliche Ernährung im engeren Sinne betreffen, sind damit geschildert, und in einigen Worten seien noch einmal die Ergebnisse derselben kurz zusammengefaßt.

A. a) Geeignete Stickstoffquellen sind Pepton, Hämoglobin und Albumin, nicht aber Amidsubstanzen wie Asparagin und Asparaginsäure etc. Die genannten Stickstoffquellen reichen zur Ernährung vollständig aus, und zwar hängen Wachstum und Denitrifikation sehr wesentlich von der Menge der dargebotenen Stickstoffquelle ab.

b) Der Hinzufügung einer besonderen Kohlenstoffquelle bedarf es nicht; jedoch wirken Zusätze gewisser organischer Kohlenstoffverbindungen — besonders solche von Galaktose, Lävulose, Dextrose, weniger intensiv solche von Mannit und von Maltose — fördernd auf Wachstum und Denitrifikation ein.

B. Seesalzgehalt der Nährböden ist zum Gedeihen der Bakterien nicht unbedingt erforderlich; auch in Süßwassersubstraten findet Bacterium actinopelte geeignete Bedingungen für Wachstum und Denitrifikation.

C. Zymotische Nahrung ist gleichfalls zum Wachstum nicht unbedingt notwendig. Der Gehalt der Nährböden an Calciumnitrit darf 1 Proz. nicht wesentlich überschreiten. Die Nitritzerstörung verläuft am intensivsten in einer $^1/_4$ proz. Lösung.

D. Bacterium actinopelte ist typischer Reduktionen fähig. Salpetersaure Salze — sicher gilt dies wenigstens von einem Teil der dargebotenen Salzmenge — werden zunächst zu Nitriten reduziert, ehe dann die Entwicklung von Stickstoff beginnt. — Methylenblau wird bei geeigneter Konzentration entfärbt. — Neutralrot wird, allerdings nicht immer, in eine fluorescierende Substanz umgewandelt. — Indigo, in Form von indigodisulfosaurem Natrium den Nährlösungen zugesetzt, wird von Bacterium actinopelte nicht entfärbt.

6. Versuche über die Beziehung zwischen Denitrifikation und Sauerstoffbedürfnis.

Die Umwandlung von Nitrit in Stickstoff ist keine einfache Reduktionserscheinung; dennoch kann sie insofern mit einem Reduktionsprozeß verglichen werden, als auch hier ein Sauerstoffgewinn erzielt

wird. Von dieser Tatsache ausgehend, ist betont worden, der Sauerstoffgewinn bei der Denitrifikation sei für den betreffenden Organismus die Hauptsache, wenigstens in einigen Fällen. Die Bedeutung der Gärung in physiologischer Hinsicht bestehe darin, Sauerstoff für Atmungszwecke herbeizuschaffen. Für diese Annahme sprach vor allen Dingen der Umstand, daß die Bakterien nur dann ohne zymotische Nahrung gedeihen könnten, wenn ihnen Sauerstoff aus der Luft zur Verfügung stehe. Ich habe nun Bacterium actinopelte nach diesem Gesichtspunkte untersucht und gefunden, daß auch dieses bei Abwesenheit von zymotischer Nahrung ein sehr ausgesprochenes Bedürfnis nach Luft zeigt. Experimentell habe ich das in der folgenden Weise dartun können. Reagensgläschen wurden mit geeigneter Nährlösung (100 g Aqua destillata, 1 g Pepton, 1 g Mannit, 26 g Seesalz) beschickt, und in diese wurde Bacterium actinopelte ausgesät. Wie bei andern Versuchen wurde dann die Nährlösung mit sterilem Paraffinum liquidum nach dem Impfen übergossen und dann die reichlich in der Lösung enthaltene Luft durch Auspumpen entfernt. Sehr bald bemerkte ich ein deutliches Wachstum. Die Nährlösung trübte sich ein wenig, auf der Oberfläche bemerkte ich unmittelbar unter dem Paraffin ein Häutchen, herrührend, wie ich nachweisen konnte, von Bacterium actinopelte. Eine strikt anaërobe Methode ist dies ja nicht, und geringe Mengen von Sauerstoff — es war dies früher schon betont worden — gelangen durch das Paraffinum liquidum hindurch. Daher deutete der Umstand, daß gerade das ausgeprägteste und stärkste Wachstum sich an der Oberfläche zeigte, auf ein Sauerstoffbedürfnis hin. Bei ungehindertem Luftzutritt zeigt sich dieses Häutchen nicht so deutlich an der Oberfläche des Nährbodens.

Noch deutlicher zeigte ein anderer Versuch das große Sauerstoffbedürfnis des Bacterium actinopelte bei Abwesenheit von zymotischer Nahrung. Als Nährboden diente eine Gelatine von folgender Zusammensetzung:

1000 g Aqua destillata,
10 - Pepton,
10 - Mannit,
26 - Seesalz,
150 - Gelatine.

Mit diesem Nährboden wurden mehrere Reagensgläschen bis zu $^1/_4$ ihrer Höhe beschickt. Die Gelatine wurde dann nach dem Sterilisieren geschmolzen und zur Entfernung der etwa in ihr enthaltenen Luft einige Zeit einer Temperatur von 100° ausgesetzt. Nunmehr wurde die Gelatine in den Röhrchen schnell auf etwa 30° abgekühlt und in dem noch eben flüssigen Nährboden unter Vermeidung jeglichen Schüttelns aus einer in Gärung begriffenen Kultur etwas Material von Bacterium actinopelte hineingebracht. Darauf wurden die Röhrchen in kaltes Wasser getaucht, so daß die Gelatine schnell erstarrte. Nachdem dies erreicht worden, wurde auf die beimpfte Gelatine vorher verflüssigte und sterile hinaufgegossen (von einer Temperatur von 30° und von derselben Zusammensetzung wie die in dem Röhrchen schon vorhandene). Selbstverständlich war auch aus der hinaufgegossenen Gelatine die Luft soweit wie möglich durch Kochen gründlich entfernt worden, und beim Hinaufgießen wurde alles Schütteln vermieden. Das Röhrchen wurde abermals in kaltes Wasser getaucht, so daß auch die aufgegossene Gelatine schnell erstarrte. Die Röhrchen, die in der üblichen Weise durch Wattestopfen verschlossen waren, wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach mehreren Tagen konnte

ich mich überzeugen, daß in dem beimpften Teil der Gelatine — offenbar infolge Sauerstoffmangels — kein Wachstum eingetreten war. In dem aufgegossenen Teil der Gelatine, und zwar nur ganz nahe an der Oberfläche, bemerkte ich ein Wachstum, indem sich dort dicht aneinander gedrängt Kolonien zeigten. Etwas tiefer unter der Oberfläche waren dagegen keine Kolonien mehr zur Entwicklung gelangt. Offenbar hatte die aufgegossene flüssige Gelatine bei Berührung mit der schon erstarrten diese an der Oberfläche etwas geschmolzen, und aus der so geschmolzenen Gelatine waren dann einige Keime in die hinaufgegossene, noch flüssige gelangt, so daß diese nunmehr auch infiziert worden war. Jedoch nur diejenigen Keime, die bis an die Oberfläche kamen, konnten sich zu Kolonien entwickeln. Auch dieser Versuch zeigt, daß Bacterium actinopelte bei Abwesenheit von zymotischer Nahrung — es war ja nitritfreie Gelatine verwendet worden — nur gedeiht, wenn Sauerstoff vorhanden ist. In dieser Hinsicht stimmt Bacterium actinopelte mit den früher untersuchten Arten völlig überein.

Trotz dieser Tatsache ist es jedoch hinsichtlich des Bacterium actinopelte zum mindesten zweifelhaft, ob hier die Nitritzerstörung als Mittel zur Gewinnung von Atmungssauerstoff aufgefaßt werden darf. Wenn der bei der Zerstörung von salpetriger Säure frei gewordene Sauerstoff in den Dienst der Atmung treten und eine Ergänzung bzw. Ersetzung des etwa fehlenden Sauerstoffs der Luft bieten soll, dann müßte die Nitritzerstörung doch zweifellos intensiver verlaufen, wenn der Luftzutritt beschränkt bzw. ganz behindert ist, als bei ungehindertem Luftzutritt. Hiervon konnte ich mich nun nicht überzeugen. Schon Baur hat beobachtet, daß in gelüfteten Kulturen eine Steigerung

der Denitrifikation stattfindet. Auch nach meinen Erfahrungen muß ich bestätigen, daß jedenfalls eine Beschränkung des Luftzutritts niemals eine Verstärkung der Nitritzerstörung, auch nicht vorübergehend, herbeigeführt. Zwei Versuche, die ich nach dieser Richtung vornahm, ergaben dasselbe Resultat. Ehe ich dieselben schildere, möchte ich bezüglich der Nährböden noch folgende Benennungen einführen: Mit dem Namen $^1/_4$proz. Normalnährlösung bezeichne ich eine Lösung von folgender Zusammensetzung:

1000 g Aqua destillata,
10 - Pepton,
10 - Mannit,
26 - Seesalz,
2,5 - Calciumnitrit.

Mit dem Namen $^1/_2$proz. Normalnährlösung bezeichne ich eine solche, welche dieselbe Zusammensetzung besitzt, jedoch 5 g Calciumnitrit auf 1 Liter Wasser enthält.

Hohe Reagensgläser wurden mit der gleichen Menge $^1/_4$proz. Normalnährlösung beschickt und die gleiche Menge derselben Lösung in verschiedene Erlenmeyerkolben gefüllt. Die Abmessungen der hohen Röhren waren so gewählt, daß eine Menge Nährlösung (70 ccm), welche den Boden eines Liter-Erlenmeyerkolbens gerade bedeckte, die Röhren bis oben hin ausfüllte. Jede Röhre und jeder Kolben enthielt 70 ccm, mithin 175 mg Calciumnitrit. Obgleich Kolben wie Röhren nur in der üblichen Weise durch Wattestopfen verschlossen waren, war der Luftzutritt zu der Nährlösung in den Kolben zweifellos reichlicher als zu der in den hohen Röhren. Trotzdem fand in der in den Röhren befindlichen Lösung nach dem Impfen keine stärkere Denitrifikation statt als in der in den Kolben befindlichen. Während nämlich vier Tage nach dem

Impfen sowohl in den Kolben wie in den hohen Röhren noch deutlich Calciumnitrit mittels Diphenylaminschwefelsäure nachweisbar war, war am fünften Tage in den Kolben sowie in den Röhren alles Nitrit zerstört. Bemerkt sei noch, daß die Vergärung der 175 mg Calciumnitrit bei 30° erfolgte.

Ein zweiter Versuch zeigte noch deutlicher, daß Luftmangel keine Steigerung der Nitritzerstörung herbeiführt. Eine größere Zahl von Reagensröhrchen wurde mit geeigneter Nährlösung beschickt und nach dem Sterilisieren Bacterium actinopelte hierin ausgesät. In einem Teil der Röhrchen wurde die Nährlösung — wie das bei früher beschriebenen Versuchen auch geschehen war — nach dem Impfen gegen die Luft dadurch abgesperrt, daß sie mit einer mehrere Zentimeter hohen Schicht von sterilem Paraffinum liquidum übergossen wurde. In den übrigen Röhrchen wurde die Nährlösung nicht in dieser Weise überschichtet, der Luftzutritt also unbehindert gelassen. Beide Arten von Röhrchen waren in der üblichen Weise durch Wattestopfen verschlossen worden, jedoch nur ganz lose, um möglichst vollständig die Luft aus der Nährlösung durch Auspumpen entfernen zu können. Nachdem dies geschehen, wurden die Röhrchen bei 30° im Thermostaten bebrütet. Nach zwei Tagen bemerkte ich in den mit Paraffinverschluß versehenen Röhrchen ein lebhaftes Aufsteigen von Gasblasen durch Lösung und Paraffin hindurch, eine ebenso starke Gasentwicklung aber auch in den übrigen Röhrchen. Jedes Röhrchen enthielt 15 ccm ¼proz. Normalnährlösung, mithin 37,5 mg Calciumnitrit. Diese Menge wurde in den mit Paraffin gegen die Luft abgesperrten Kulturen bei einer Temperatur von 30° in durchschnittlich 4 Tagen zerstört; in den gelüfteten Kulturen erforderte die Zerstörung dieser Menge von Calciumnitrit durch-

schnittlich nur 3 Tage. Ein weiterer Vergleichsversuch wurde bei Zimmertemperatur vorgenommen: bei diesem Versuche wurden 37,5 mg Calciumnitrit in durchschnittlich 8 bis 9 Tagen in den durch Paraffin abgesperrten Kulturen zerstört. Bei ungehindertem Luftzutritt erfolgte die Zerstörung derselben Menge von Calciumnitrit in durchschnittlich 5 bis 6 Tagen. Ein anderer Vergleichsversuch wurde unter Verwendung von $^1/_2$ proz. Normalnährlösung vorgenommen. Jedes Röhrchen enthielt wiederum 15 ccm der Lösung, daher 75 mg Calciumnitrit. Die Kultur erfolgte bei 30°. Die genannte Menge des Salzes wurde unter diesen Bedingungen in durchschnittlich 6 Tagen bei Paraffinverschluß, in durchschnittlich 5 Tagen bei ungehindertem Luftzutritt zerstört. Bei einem weiteren Vergleichsversuch, bei dem gleichfalls $^1/_2$ proz. Normalnährlösung als Substrat diente, wurden bei Zimmertemperatur 75 mg Calciumnitrit bei Paraffinverschluß in durchschnittlich 8 Tagen, bei unbehindertem Luftzutritt in durchschnittlich 7 Tagen zerstört.

Die angeführten Versuche zeigen also, daß durch Luftmangel keine Steigerung der durch Bacterium actinopelte bewirkten Denitrifikation herbeigeführt werden kann. Der zweite der geschilderten Vergleichsversuche zeigte vielmehr in den verschiedensten Anordnungen hinsichtlich der dargebotenen Nitritmenge und hinsichtlich der Temperatur, daß Luftmangel eine Verminderung der Denitrifikationsgeschwindigkeit herbeiführt. Unter diesen Umständen halte ich es — wenigstens soweit Bacterium actinopelte in Frage kommt — nicht für zulässig, die Nitritzerstörung als Mittel zur Herbeischaffung von Atmungssauerstoff aufzufassen, wenn auch bei Bacterium actinopelte ein Bedürfnis nach Sauerstoff sowohl bei Abwesenheit

wie bei Anwesenheit von zymotischer Nahrung unzweifelhaft vorhanden ist.

Bacterium actinopelte besitzt nun außer seiner Fähigkeit, Nitrite zu zerstören, noch ein ausgesprochenes Reduktionsvermögen. Vielleicht haben wir in dieser Fähigkeit, solche typischen Reduktionen auszuführen, ein Mittel zur Herbeischaffung von Sauerstoff zu Atmungszwecken zu sehen. Es müßte experimentell nachgewiesen werden, daß die Entfärbung von Methylenblau ebenso wie die Überführung von Nitrat in Nitrit bei Mangel bzw. Abwesenheit von Luftzutritt intensiver verläuft als bei Luftzutritt. Mit Methylenblau nach dieser Richtung zu arbeiten, hat nach meinen Erfahrungen große Schwierigkeiten; denn bekanntlich wirken größere Mengen von solchen Teerfarbstoffen in den Nährböden nachteilig auf das Bakterienwachstum ein, und mit größeren Mengen müßte doch operiert werden, wenn man zu zuverlässigen Vergleichsresultaten gelangen wollte. Selbst aber, wenn Bacterium actinopelte größere Mengen des Farbstoffs in seinen Nährböden ertragen, und selbst, wenn eine stärkere Reduktion des Farbstoffs bei Luftabschluß erzielt werden könnte, bewiese dies nichts. Die etwa in gelüfteten Kulturen beobachtete schwächere Entfärbung könnte auch darauf zurückgeführt werden, daß der Luftsauerstoff rein spontan die durch Bacterium actinopelte bewirkte Entfärbung rückgängig macht.

Andererseits, den Nachweis zu erbringen, daß das Nitrat bei Luftmangel stärker und schneller in Nitrit umgewandelt wird, ist äußerst schwierig experimentell durchzuführen, weil das entstandene Nitrit gleich weiter in Stickstoff und Stickstoffoxydul umgewandelt wird, und weil es ferner nicht erwiesen ist, ob nicht ein Teil des Salpeters direkt in Stickstoff bzw. Stick-

stoffoxydul umgewandelt wird. Ich habe bei Vergleichsversuchen ähnlicher Art wie die oben geschilderten stets die Beobachtung gemacht, daß auch die Nitratzerstörung bei ungehindertem Luftzutritt wesentlich schneller verläuft als bei Luftabschluß oder behindertem Luftzutritt. Die Unterschiede zwischen der Zeitdauer der Nitratzerstörung bei behindertem und bei unbehindertem Luftzutritt waren wesentlich größer als die entsprechenden Zeitunterschiede bei der Nitritzerstörung. Dies spricht zwar nicht für die Annahme, daß die Reduktion von Nitrat zu Nitrit durch Luftabschluß gefördert werde, beweist aber auch nicht das Gegenteil einwandfrei, wie folgende Überlegung lehrt. Wenn nämlich, was durchaus nicht ausgeschlossen, ein Teil des Salpeters direkt zerstört würde, und zwar ebenso wie das Nitrit bei Luftmangel schwächer als bei Luftzutritt, so könnte man — auch wenn die Reduktion des andern Teils des Salpeters zu Nitrit gerade bei Luftmangel intensiver vor sich ginge — doch unter Umständen in einer anaëroben Kultur länger Salpeter vorfinden als in einer gelüfteten. Die von mir gemachte Beobachtung, daß in gelüfteten Kulturen aller Salpeter schneller als in den anaëroben Kulturen verschwunden ist, läßt daher die Frage offen, in welcher der beiden Kulturen die Reduktion des Salpeters zu Nitrit intensiver und schneller vor sich geht.

II. Biologische Versuche.

Die bisherigen Versuche ließen keinen Schluß zu über eine physiologische Deutung der Gärung. Es lag nun nahe, die Frage zu untersuchen, ob eine biologische Deutung der Gärung im Sinne der Wortmannschen Theorie zulässig sei. Ich habe die Frage untersucht, ob sich Anhaltspunkte für die Auffassung fänden, daß gewisse bei der Gärung auftretende Stoffe als Schutzstoffe des Bacterium actinopelte andern konkurrierenden Arten von Mikroben gegenüber wirken. Nach meinen Resultaten glaube ich zu dieser Annahme nicht berechtigt zu sein. Zwei Fragen habe ich hier untersucht; einmal die Frage, ob Bacterium actinopelte durch Anwesenheit anderer Bakterien in demselben Substrat zu einer gesteigerten Gärtätigkeit angeregt wird. Weiter habe ich dann untersucht, ob Bacterium actinopelte imstande ist, andere mit ihm in demselben Nährboden wachsende Bakterien zu überwuchern, und ob eine solche etwaige Verdrängung durch die Gärtätigkeit bedingt ist.

Ich arbeitete mit vier verschiedenen Arten, die mit Bacterium actinopelte in Konkurrenz treten sollten. Die Auswahl war nicht ganz leicht. Es mußten Organismen sein, die sich in ihren Wachtumsformen von Bacterium actinopelte deutlich unterschieden, und die andrerseits einen gewissen Gehalt an Seesalz und an Nitrit in den Nährböden zu ertragen vermochten.

Derartige Bakterien isolierte ich aus einem Seewasseraquarium unseres Laboratoriums, das mit Schlick aus der Kieler Bucht beschickt worden war, und ich erhielt so drei für meine Zwecke gut passende Organismen in Reinkultur. Die Isolierung geschah in folgender Weise: Zuerst impfte ich $^1/_4$proz. Normalnährlösung mit einem Tropfen des Aquariumwassers. Nachdem ich dann in der Nährlösung deutliches Wachstum wahrgenommen hatte, goß ich Gelatineplatten, die mit etwas Material aus der beimpften Nährlösung infiziert worden waren. Auf der Gelatine entwickelten sich Kolonien, und diejenigen, die sich bei mikroskopischer Betrachtung recht deutlich von Bacterium actinopelte unterschieden, impfte ich ab. Ich erhielt so drei Spezies in Reinkultur, auf deren Beschreibung ich mit einigen Worten eingehe.

1. Bacillus α: Ziemlich lange, sehr bewegliche Stäbchen; sporenbildend; sowohl auf Agar wie auf Gelatine wachsend. Agar- und Gelatinestrichkulturen bilden weiße schleimige Überzüge, deren Ränder gelappt sind. Die in Gelatineplatten entstandenen Kolonien zeigten bei schwacher Vergrößerung eine gelbe bis braune Farbe, ältere Kolonien eine rissige Oberfläche. In flüssigen Substraten ruft der Bacillus sowohl eine Trübung als auch die Bildung einer Haut hervor. Pepton ist eine geeignete Stickstoff- und Kohlenstoffquelle. Der Hinzufügung einer besonderen Kohlenstoffquelle bedarf es nicht.

2. Bacillus β: Schmale, sehr bewegliche und ziemlich kleine Stäbchen; sporenbildend; sowohl auf Agar als auf Gelatine wachsend. Agar- und Gelatinestrichkulturen bilden gleichfalls weißliche Überzüge von schleimiger Beschaffenheit. Die Ränder dieser Überzüge sind nicht gelappt. Die in Gelatineplatten erhaltenen Kolonien zeigen, bei schwacher Vergröße-

rung betrachtet, hellgelbe Färbung. Sie sind scharf umrandet; die Oberfläche erscheint punktiert. In flüssigen Substraten ruft der Bacillus nur eine Trübung, keine Hautbildung hervor. Hinsichtlich der Kohlenstoff- und der Stickstoffquellen verhält er sich wie Bacillus α.

3. Bacterium γ: Bewegliche Stäbchen: keine Sporen bildend; dem von Fischer beschriebenen Halibacterium pellucidum sehr ähnlich, jedoch nicht mit ihm identisch, da es, im Gegensatz zu Halibacterium pellucidum, in die Tiefe wächst. Die Gelatinestrichkultur, von sehr charakteristischem Aussehen, bildet einen fast durchsichtigen, in auffallendem Lichte fluorescierenden Überzug. Die Oberflächenkulturen auf Gelatineplatten bilden hyaline, völlig durchsichtige Tröpfchen. In flüssigen Nährmedien ruft Bacterium γ keine Trübung hervor, wächst jedoch in durchsichtigen, zerrissenen und irisierenden Häuten. Geeignete Stickstoffquellen sind Pepton, Asparagin und Ammoniumsulfat. Bei Darbietung der letztgenannten Stickstoffquelle ist die Hinzufügung von Mannit als Kohlenstoffquelle nötig, bei Darbietung von Pepton und Asparagin dagegen nicht.

Bezüglich aller drei beschriebenen Formen sei bemerkt, daß keine von ihnen Gelatine verflüssigt.

Außer diesen drei Organismen benutzte ich nun noch einen vierten, nämlich eine gelbe, gelatineverflüssigende Sarcina.

Zunächst untersuchte ich nun, ob die Anwesenheit eines dieser vier Organismen etwa Bacterium actinopelte zu einer gesteigerten Nitritzerstörung anregt. Eine Reihe von hohen Reagensgläsern wurde mit $\frac{1}{4}$proz. Normalnährlösung beschickt, und zwar jedes mit 70 ccm, und in diese Nährlösungen wurde Bacterium actinopelte ausgesät. In einigen Kulturen

ließ ich Bacterium actinopelte allein, zu anderen fügte ich etwas Material von Reinkulturen der beschriebenen Organismen hinzu, und zwar immer nur von einer dieser Kulturen. Es zeigte sich, daß die Anwesenheit eines der fremden Organismen keine Steigerung der Denitrifikation bewirkt. Die Zerstörung der 175 mg Calciumnitrit, die in jedem Reagensglase vorhanden waren, erforderte bei Zimmertemperatur 7 Tage, gleichviel ob Bacterium actinopelte sich in Reinkultur befand oder in Gemeinschaft mit einem der vier Organismen. Mehrere Versuche dieser Art ergaben im wesentlichen das gleiche Resultat.

Weiter untersuchte ich, ob Bacterium actinopelte die genannten Organismen zu überwuchern vermag. Ich ging dabei in folgender Weise vor. Material von Bacterium actinopelte und von Sarcina wurde gemeinsam auf $^1/_4$proz. Normalnährlösung ausgesät, und zwar standen den Organismen 70 ccm der Lösung zur Verfügung. Nach 5 Tagen goß ich aus dieser Kultur A Gelatineplatten, um das Verhältnis der Keimzahlen beider Organismen ermitteln zu können. Ich entnahm zu diesem Zweck der Kultur A 0,5 ccm der vorher gründlich durchgeschüttelten Nährlösung mittels steriler Pipette, verdünnte diese Menge mit steriler Normalnährlösung auf 15 ccm, und mit letzterer impfte ich dann die Gelatine.

Aus der Kultur A impfte ich aber außerdem noch am selben Tage auf 70 ccm $^1/_4$proz. Normalnährlösung weiter, überließ die so erhaltene Kultur B 4 Tage sich selbst, analysierte die Kultur B genau wie A durch Plattengießen und impfte außerdem von Kultur B abermals auf 70 ccm $^1/_4$proz. Normalnährlösung. Der so erhaltenen Kultur C entnahm ich dann nach 4 Tagen abermals eine Probe zur Analyse. Ich erhielt auf diese Weise drei Platten, die mikroskopisch

beobachtet wurden, und die den Kulturen A, B und C entsprechen. Bemerkt sei, daß 70 ccm ¼proz. Normalnährlösung so viel Nitrit enthalten, daß Bacterium actinopelte zur Vergärung desselben 4—5 Tage gebraucht. Sarcina befand sich daher in diesen drei Kulturen stets in einem in lebhafter Gärung begriffenen Nährboden.

Eine zweite Reihe von Kulturen wurde in anderer Weise angelegt. Wiederum wurde Material einer Reinkultur von Bacterium actinopelte und von Sarcina gemeinsam ausgesät, jetzt aber auf geeignete nitritfreie Seesalzpeptonmannitnährlösung (70 ccm). Nach 5 Tagen wurde auch diese Kultur D durch Plattengießen analysiert und außerdem von Kultur D auf nitritfreie Lösung (70 ccm) weitergeimpft. Nach 4 Tagen wurde auch diese neu erhaltene Kultur E analysiert und von ihr auf nitritfreie Nährlösung (70 ccm) weitergeimpft. Die so erhaltene Kultur F wurde dann 4 Tage nach ihrer Anlage analysiert. Auf diese Weise erhielt ich wiederum drei weitere Gelatineplatten, die die Zusammensetzung der Kulturen D, E und F zeigten.

Drittens wurde dann Material einer Reinkultur von Sarcina allein auf 70 ccm ¼proz. Normalnährlösung ausgesät, die so erhaltene Kultur G nach 5 Tagen analysiert und auch von ihr weiter auf nitrithaltige Nährlösung übergeimpft. Die so erhaltene Kultur H wurde genau in derselben Weise behandelt, also nach 4 Tagen durch Plattengießen analysiert und von ihr weitergeimpft und schließlich die zuletzt erhaltene Kultur I 4 Tage nach ihrer Anlage analysiert.

Von jeder Reihe erhielt ich also drei Platten, entsprechend den Kulturen A—C, D—F und G—I.

Nicht nur Sarcina, sondern auch jeder der drei andern Organismen wurde in zwei Versuchsreihen

gemeinsam mit Bacterium actinopelte kultiviert und in einer dritten allein, genau ebenso, wie dies für Sarcina geschildert. Hinsichtlich der Bezeichnungen sei bemerkt, daß die in den verschiedenen Versuchsreihen einander entsprechenden Kulturen dieselben Buchstaben führen, und daß auch die Platten gleichfalls mit denselben Buchstaben bezeichnet sind wie die Kulturen, deren Zusammensetzung sie angeben. A, D, G sind also überall die Ausgangskulturen (B, C bzw. E, F bzw. H, I die daraus durch das Überimpfen erhaltenen).

Es zeigte sich, daß sowohl Sarcina als auch Bacterium γ nicht gegen Bacterium actinopelte aufzukommen vermögen, sowohl in den Kulturen A bis C als auch in den Kulturen D bis F, also sowohl in den in Gärung begriffenen als auch in den nitritfreien Kulturen. Die diesen Kulturen entsprechenden Platten zeigten nur Bacterium actinopelte. In den Platten G bis I dagegen zeigte sich ein sehr üppiges Wachstum von Sarcina in einem Falle, von Bacterium γ im andern Falle. Die beobachtete Verdrängung der beiden Organismen in den Kulturen A bis C bzw. D bis F rührte somit von der Anwesenheit des Bacterium actinopelte her, das ja in den Kulturen G bis I fehlte. Betont sei, daß diese Verdrängung beidemal in beiden Reihen A bis C und D bis F beobachtet wurde, also sowohl in gärendem wie in nicht in Gärung begriffenem Substrat. Die Gärtätigkeit kann mithin nicht als Ursache der Verdrängung aufgefaßt werden.

Eine zweite mit Bacterium γ in derselben Weise vorgenommene Versuchsreihe zeigte ein spärliches Wachstum dieses Organismus gegenüber dem Bacterium actinopelte in den Kulturen A bis C und in den Kulturen D bis F. In den Kulturen G bis I war

das Wachstum des Bacterium γ genau wie bei der vorigen Versuchsreihe ein durchaus normales. Hier ergab die Keimzählung, daß in den Kulturen A bis C auf einen Keim von Bacterium γ durchschnittlich 50 bis 60 Keime von Bacterium actinopelte kamen; in den nitritfreien Kulturen D bis F kamen auf einen Keim von Bacterium γ sogar 100 Keime von Bacterium actinopelte. Diese Tatsache wie der Umstand, daß keine allmähliche Anreicherung des Bacterium actinopelte bemerkt werden konnte, spricht gleichfalls nicht dafür, daß die Gärtätigkeit Ursache der Verdrängung ist: denn in den Ausgangskulturen A (bzw. D) war das Verhältnis der Keimzahlen zwischen beiden Organismen im wesentlichen dasselbe wie in den Endkulturen C bzw. F.

Ein anderes Ergebnis zeigte sich bei Benutzung des Bacillus β. Die Platten aus den in Gärung begriffenen Kulturen A, B, C zeigten ebenso wie die aus den nitritfreien Kulturen D, E, F ein allmähliches Anwachsen des Bacterium actinopelte gegenüber seinem Konkurrenten. Es kamen auf einen Keim des Bacillus β in der Ausgangskultur A 2 Keime von Bacterium actinopelte, in der Endkultur C 4,5 Keime des letzteren, in der Ausgangskultur D auf einen Keim des Bacillus β 1,5 Keime des Bacterium actinopelte, in der Endkultur F 1,8 Keime von Bacterium actinopelte. Demnach verdrängt Bacterium actinopelte sowohl bei Gegenwart als auch bei Abwesenheit von Nitrit Bacillus β. In den Kulturen G, H, I, hier ohne Konkurrenz eines andern Organismus in Nitritnormallösung kultiviert, zeigte Bacillus β ein sehr üppiges Wachstum, wie die Platten ergaben.

Bacillus α verhielt sich dem Bacterium actinopelte gegenüber ähnlich wie Bazillus β. Es kamen auf einen Keim des Bazillus α in der Ausgangs-

kultur A 12 Keime von Bacterium actinopelte, in der Endkultur C 89 des letzteren; in der Ausgangskultur D kam auf einen Keim von Bacillus α 1 Keim von Bacterium actinopelte, in der Endkultur F dagegen auf einen Keim von Bacillus α 25 von Bacterium actinopelte. In den Kulturen G bis I war das Wachstum des Bacillus α, wie die Platten ergaben, ein normales. Also sowohl bei Gegenwart als bei Abwesenheit von Nitrit verdrängt Bacterium actinopelte Bacillus α; die Verdrängung kann also nicht als Folge der Gärtätigkeit angesehen werden.

Das Ergebnis der biologischen Versuche ist also folgendes:

1. Die Anwesenheit eines der vier Organismen im Nährsubstrat vermag Bacterium actinopelte zu einer gesteigerten Gärtätigkeit nicht zu veranlassen.

2. Die vier genannten Organismen werden von Bacterium actinopelte teils schnell, teils weniger schnell überwuchert, so daß durch wiederholtes Überimpfen eine Anreicherung des Bacterium actinopelte herbeigeführt werden kann. Eine solche Anreicherung findet sowohl in gärendem wie in nitritfreiem Substrat statt, indem in beiden Fällen Bacterium actinopelte die Konkurrenten zurückdrängt. Nach diesem Befund könnte also die Gärtätigkeit nicht als Ursache der Zurückdrängung jener Organismen angesehen werden.

Diese beiden Ergebnisse der biologischen Versuche sprechen jedenfalls nicht dafür, daß wir berechtigt sind, in der Gärtätigkeit des Bacterium actinopelte ein Schutzmittel zur Verdrängung konkurrierender Organismen zu sehen.

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde im botanischen Institut der Universität Berlin ausgeführt. Für die freundliche Unterstützung bin ich Herrn Geh. Rat Schwendener und Herrn Privatdozenten Dr. Baur zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf.

Otto Wegner, evangelischer Konfession, wurde am 10. November 1880 zu Berlin als Sohn des verstorbenen Rektors Wegner geboren. Von der hiesigen Friedrich-Werderschen Oberrealschule im März 1900 mit dem Zeugnis der Reife entlassen, studierte er von Ostern 1900 bis Herbst 1902 Chemie und Mineralogie an der Technischen Hochschule zu Berlin und von Herbst 1902 bis Ostern 1905 beschreibende Naturwissenschaften an der Universität Berlin. Darauf arbeitete er im hiesigen botanischen Institut und legte im Januar 1907 das Staatsexamen für das höhere Lehramt in Berlin ab. Das Seminarjahr absolvierte er von Ostern 1907 bis Ostern 1908 am Königstädtischen Realgymnasium zu Berlin, das Probejahr an der II. und VIII. Realschule daselbst von Ostern 1908 bis Ostern 1909. Seit 1. April 1909 ist er Oberlehrer an der Luisenstädtischen Oberrealschule zu Berlin. Am 24. Februar 1910 bestand er vor der philosophischen Fakultät der hiesigen Universität das Doktorexamen.

Seine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren:

Ascherson, Baur, Deegener, Fischer, Klein, Kolkwitz, Lehmann, Möbius, Potonié, Schwendener, F. E. Schulze, Schwarz, Stumpf, Warburg.

Buhle, Dziobek, H. Erdmann, Hirschwald, Hörmann, Jolles, v. Knorre, Koch, Krüger, Kühling, Liebermann, C. Müller, Paalzow, Stavenhagen, Witt.